

中华人民共和国国家标准

GB/T 21995—2008

饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of nitroimidazoles in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2008-06-17 发布

2008-10-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国农业大学动物医学院。

本标准主要起草人：沈建忠、张素霞、程林丽、肖希龙、李晓薇、曹兴元、王战辉。

饲料中硝基咪唑类药物的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中硝基咪唑类药物含量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑和替硝唑含量的测定。

本标准的检测限：饲料中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑和替硝唑均为 $8 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本标准的定量限：饲料中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑和替硝唑均为 $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682-1992, neq ISO 3696:1987）

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 方法原理

用乙酸乙酯提取试样中的硝基咪唑类药物，浓缩至近干后，溶解于 0.1 mol/L 磷酸中，经正己烷液分配和 MCX 固相萃取柱净化，用液相色谱-串联质谱法测定，以色谱保留时间和质谱碎片离子共同定性，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T 6682 中规定的二级水。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 乙酸乙酯。

4.4 磷酸。

4.5 正己烷。

4.6 甲酸：色谱纯。

4.7 MCX 固相萃取柱：规格为 60 mg。

4.8 微孔滤膜：规格为 $0.2 \mu\text{m}$ 。

4.9 甲硝唑（metronidazole）：纯度 $\geq 98\%$ 。

4.10 洛硝哒唑（ronidazole）：纯度 $\geq 98\%$ 。

4.11 二甲硝唑（dimetridazole）：纯度 $\geq 98\%$ 。

4.12 替硝唑（tinidazole）：纯度 $\geq 98\%$ 。

4.13 磷酸溶液（ 0.1 mol/L ）：取 3.4 mL 磷酸于 1 L 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀。

4.14 固相萃取柱淋洗液：氨水 + 水 + 甲醇 = 0.2 + 10 + 0.2。

4.15 固相萃取柱洗脱液:氨水+水+甲醇=0.2+2+8。

4.16 硝基咪唑类药物混合标准贮备液(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$):称取甲硝唑(4.9)、咯硝哒唑(4.10)、二甲硝唑(4.11)和替硝唑(4.12)各0.1 g(精确到0.000 1 g)于100 mL容量瓶中,用乙腈溶解定容。-20 $^{\circ}\text{C}$ 可保存3个月。

4.17 硝基咪唑类药物混合标准贮备液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$):移取1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硝基咪唑类药物混合标准贮备液(4.16)10 mL于50 mL容量瓶中,用乙腈稀释定容。4 $^{\circ}\text{C}$ 可保存1个月。

4.18 标准工作液:移取适量200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硝基咪唑类药物混合标准贮备液(4.17),用乙腈稀释定容,配制成0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液。4 $^{\circ}\text{C}$ 可保存1周。

5 仪器和设备

5.1 实验室常用仪器、设备。

5.2 液相色谱-串联质谱联用仪;配电喷雾离子源。

5.3 分析天平;感量为0.01 g和0.000 1 g。

5.4 旋涡混合器。

5.5 离心机。

5.6 振荡器。

5.7 旋转蒸发仪。

5.8 固相萃取装置。

6 采样与试样制备

按GB/T 14699.1规定采集试样后,按GB/T 20195规定,取有代表性的样品1 kg,四分法缩减,取约200 g,经粉碎,全部过0.45 mm孔筛,混匀装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取2 g(精确到0.01 g)试样于50 mL离心管中,加15 mL乙酸乙酯,涡动1 min,300 r/min振荡30 min,3 800 r/min离心10 min。取上清液于100 mL鸡心瓶中,下层残渣用15 mL乙酸乙酯重复提取一次。合并两次上清液,为样品提取液。

7.2 净化

将样品提取液于35 $^{\circ}\text{C}$ 浓缩至近干。加300 μL 乙酸乙酯,涡动10 s,再加4 mL正己烷,涡动30 s,全部转移至10 mL离心管中。往鸡心瓶中再加1.5 mL磷酸溶液(4.13),涡动1 min,全部转移至同一离心管中。加盖密闭,手摇混合,6 000 r/min离心10 min。吸取下层水相于5 mL试管,上层有机相用1.5 mL磷酸溶液(4.13)重复萃取一次,合并两次水相作为固相萃取上样液。

将MCX固相萃取柱安装于固相萃取装置上,依次用2 mL乙腈、2 mL磷酸溶液(4.13)活化。将固相萃取上样液加载到固相萃取柱上。依次用1 mL磷酸溶液(4.13)、2 mL固相萃取柱洗涤液(4.14)淋洗,抽真空1 min。用2 mL固相萃取柱洗脱液(4.15)洗脱。上样溶液和洗脱液的流速均控制在不超过1 mL/min。往洗脱液中加入20 μL 甲酸,混匀。50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干后,用2 mL乙腈复溶,过0.2 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

色谱柱: C_8 柱,长150 mm,内径2.1 mm,粒径5 μm ,或相当者。

流动相:甲醇+水,梯度洗脱,梯度洗脱条件见表1。

表1 梯度洗脱条件

时间/min	水/%	甲醇/%
0.0	100	0
12	30	70
16	0	100
25	100	0

流速:0.2 mL/min。

柱温:室温。

进样量:10 μ L。

7.3.2 串联质谱条件

离子化模式:电喷雾电离,正离子扫描(ESI+)。

离子源喷雾电压:4.5 kV。

离子源温度:80 $^{\circ}$ C。

脱溶剂温度:300 $^{\circ}$ C。

毛细管电压:3 V。

碰撞气:氩气。

监测模式:多反应监测。

4种硝基咪唑类药物的定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量,见表2。

表2 4种硝基咪唑类药物的定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

名称	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
洛硝哒唑	201/140	201/140	18	11
	201/55			23
甲硝唑	172/128	172/128	22	14
	172/82			23
二甲硝唑	142/96	142/96	25	16
	142/81			25
替硝唑	248/120.7	248/120.7	20	17
	248/92.7			17

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

7.3.3.1 定性测定

根据试样溶液中药物的含量,选择峰面积相近的标准工作液和样品溶液等体积参插进样。通过液相色谱保留时间与质谱选择离子共同定性。样品中待测药物与标准物质的保留时间相对偏差不大于2.5%,而且其选择离子的相对丰度的差异不大于10%。4种药物的标准溶液选择离子色谱图参见图A.1。

7.3.3.2 定量测定

分别取适量试样溶液和相应浓度的标准工作液,作单点校准或多点校准,以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内,试样液进样过程中应参插标准工作液,以便准确定量。

8 结果计算

饲料中硝基咪唑类药物的含量 X , 以质量分数计, 数值以毫克每千克 (mg/kg) 表示, 按式(1)计算:

$$X = \frac{c \times V \times n}{m} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

c ——试样液中对应的硝基咪唑类药物的浓度, 单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样液总体积, 单位为毫升 (mL);

n ——稀释倍数;

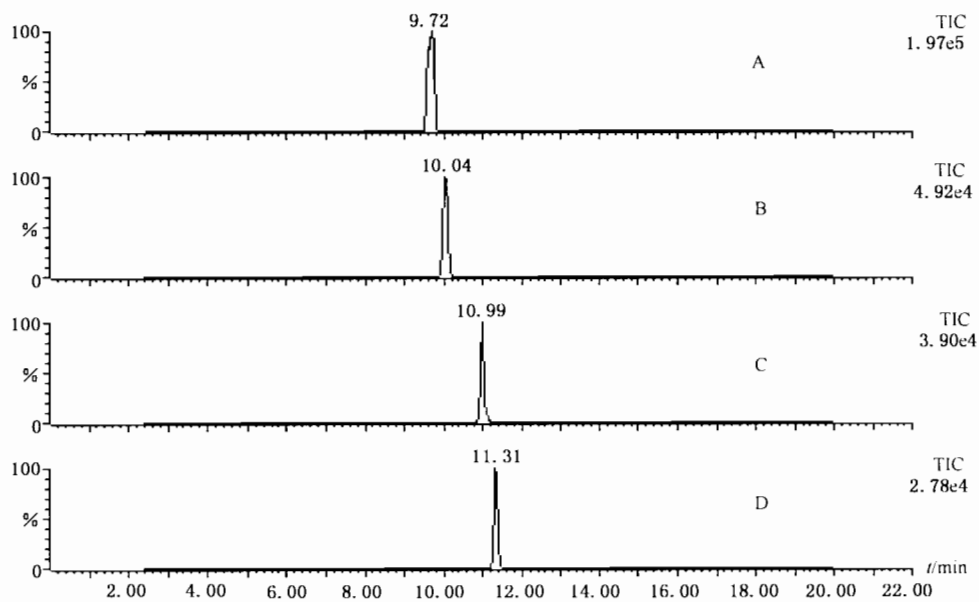
m ——试样质量, 单位为克 (g)。

测定结果用平行测定后的算术平均值表示, 保留三位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下完成的两个平行测定结果的相对偏差不大于 20%。

附录 A
(资料性附录)
标准溶液选择离子色谱图



- A —— 甲硝唑；
B —— 洛硝哒唑；
C —— 二甲硝唑；
D —— 替硝唑。

图 A.1 25 ng/mL 硝基咪唑类药物标准溶液选择离子色谱图

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
饲料中硝基咪唑类药物的测定
液相色谱-串联质谱法
GB/T 21995—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 10 千字

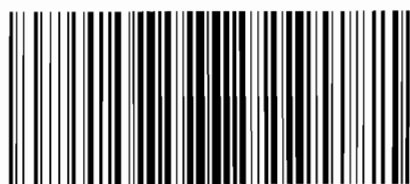
2008年8月第一版 2008年8月第一次印刷

*

书号: 155066·1-33175 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 21995-2008